

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 20520081151760

UDC\_\_\_\_\_

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

磷酸腺苷调节 HSP70 与底物作用的机制

/RKIP 与突变体的稳定性研究

The Mechanisms of Nucleotides Regulate the Interaction of

the HSP70 with Its Substrates/

The Stability of RKIP and Its Mutant

金华炜

指导教师姓名: 吴学记 副教授

赵玉芬 教 授

林东海 教 授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2011 年 月 日

论文答辩时间: 2011 年 月 日

学位授予日期: 2011 年 月 日

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 月

---

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

---

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 (    ), 在        年解密后适用本授权书。

2、不保密 ( ☒ )

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期:        年    月    日

导师签名:

日期:        年    月    日

## 目 录

## 第一部分 磷酸腺苷调节 HSP70 与底物作用的机制

摘要	1
Abstract	3
1 前言	5
1.1 热休克蛋白家族	5
1.2 HSP70 基因与蛋白质结构特点	6
1.3 HSP70 分子伴侣系统	10
1.4 HSP70 的作用机理	12
1.5 HSP70 的主要功能	14
1.6 HSP70 在疾病研究上的应用	17
1.7 本课题的研究目的与意义	19
2 材料和方法	20
2.1 材料	20
2.2 方法	25
3 结果与分析	32
3.1 分子克隆与质粒的构建	32
3.2 蛋白的表达及其分离纯化	34
3.3 圆二色谱测定蛋白的二级结构	40
3.4 野生型及突变体HSP70 体外助折叠	43
3.5 荧光标记短肽与野生型及突变体HSP70 的作用	45
3.6 ITC 滴定测定HSP70 与CHIP 蛋白的相互作用	49
4 结果与讨论	51
参考文献	53

## 第二部分 RKIP 与突变体的稳定性研究

摘要	59
Abstract	61
1 前言	63
1.1 PEBP 家族蛋白	63
1.2 RKIP 基因和表达定位	65
1.3 RKIP 与细胞信号转导通路	66
1.4 RKIP 的功能	69
1.5 RKIP 与细胞凋亡	70
1.6 RKIP 与细胞增殖、分化	71
1.7 本课题的研究目的与意义	72
2 材料和方法	73
2.1 材料	73
2.2 方法	73
3 结果与分析	86
3.1 RKIP 的基因克隆和定点突变	86
3.2 RKIP 和突变体RKIP(S153E) 的原核表达和纯化	89
3.3 ESI-FT-MS 测定蛋白的精确分子量	95
3.4 RKIP 和突变体RKIP(S153E) 的CD 检测	98
3.5 RKIP 和突变体RKIP(S153E) 的二维 <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N HSQC 实验	105
4 结果与讨论	111
参考文献	112
在学期间发表论文	119
致谢	120

# Contents

## Part 1 The Mechanisms of Nucleotides Regulate the Interaction of the HSP70 with Its substrates

<b>Abstract</b> .....	1
<b>1. Introduction</b> .....	5
1.1 The introduction of heat shock proteins.....	5
1.2 Characteristics of HSP70 gene and protein structure.....	6
1.3 HSP70 molecular chaperone.....	10
1.4 Mechanism of HSP70.....	12
1.5 The main function of HSP70.....	14
1.6 The research of HSP70 on some diseases.....	17
1.7 The purpose and meaning of this experiment.....	19
<b>2. Materials and methods</b> .....	20
2.1 Materials.....	20
2.2 Methods .....	25
<b>3. Results and analysis</b> .....	32
3.1 CHIP gene cloning.....	32
3.2 Expression and purification of proteins.....	34
3.3 The analysis of circular dichroism (CD) spectra.....	40
3.4 Fluorescence peptide interacts with the wild-type and mutants HSP70.....	43
3.5 The chaperone activity of wide-type and mutants HSP70.....	45
3.6 ITC titration analysis HSP70 interact with CHIP.....	49
<b>4. Conclusion and disscusion</b> .....	51
<b>References</b> .....	53

## Part 2 The Stability of RKIP and Its Mutant

<b>Abstract</b> .....	59
<b>1. Introduction</b> .....	63
1.1 The introduction of PEBP family proteins.....	63
1.2 Expression and localization of RKIP gene.....	65
1.3 RKIP in the cell signal transduction.....	66
1.4 The main function of RKIP.....	69
1.5 RKIP and apoptosis .....	70
1.6 RKIP and cell proliferation, differentiation.....	71
1.7 The purpose and meaning of this experiment.....	72
<b>2. Materials and methods</b> .....	73
2.1 Materials .....	73
2.2 Methods .....	73
<b>3. Results and analysis</b> .....	86
3.1 Molecular cloning and plasmid construction .....	86
3.2 Expression and Purification of RKIP and its mutant.....	89
3.3 ESI-FT-MS determination of the precise molecular weight of RKIP and its mutant.....	95
3.4 The analysis of circular dichroism (CD) spectra.....	98
3.5 $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ HSQC spectras of RKIP and RKIP (S153E).....	105
<b>4. Conclusion and disscussion</b> .....	111
<b>References</b> .....	112
<b>Publications during graduate study</b> .....	120
<b>Acknowledgement</b> .....	121

## 第一部分 磷酸腺苷调节 HSP70 与底物作用的机制

### 摘要

热休克蛋白是细胞受热等因素刺激后诱导产生的应激蛋白质，是在生物进化中高度保守的蛋白质分子家族，广泛存在于从原核到真核各种生物细胞内；后来研究证明热休克蛋白在正常生理条件下亦表达并起重要作用，其作为分子伴侣参与未折叠新生多肽链、多蛋白复合物的组装和跨膜运输、转位、蛋白质降解、细胞内蛋白质合成后的加工等一系列重要生物活动，维持细胞正常的生命活动。

在进化过程中细胞建立了由再折叠途径与降解途径组成的蛋白质质量控制 (protein quality control) 系统。作为蛋白质质量控制系统的核心，HSP70 在正常和应激条件下都具有识别非天然蛋白的能力，可识别暴露于变性蛋白或短肽表面的疏水性区域，协助它们进行重新折叠，或者将无法恢复的蛋白质转移给蛋白质降解系统，使之降解。HSP70 蛋白家族具有一个共同的三级结构：N 端高度保守 ATPase 功能域和 C 端底物结合功能域。HSP70 功能发挥依赖于 ATP 的水解，ATP 或 ADP 的结合与解离调控底物蛋白的结合和释放。

本实验采用 HSP70 的典型底物，同时结合 HSP70 磷酸腺苷结合缺失突变体 HSP70K71A、T204A、H227S 考察磷酸腺苷对 HSP70 功能的调控作用。

我们以变性荧光素酶作为复性实验底物来检测 HSP70 的分子伴侣功能。发现 HSP70K71A、T204A 突变体体外帮助变性荧光素酶的重折叠功能受到抑制，而 H227S 突变体的体外帮助变性荧光素酶的重折叠功能比野生型 HSP70 稍有降低。ADP 部分抑制了野生型 HSP70 对变性荧光素酶的重折叠，但是对第二个金属结合位点的 H227S 突变体的重折叠功能没有影响，进一步证实第二个金属结合位点可能与 ADP 结合相关。

用荧光标记的 NR 短肽考察磷酸腺苷影响 HSP70 与底物结合的动力学过程。发现 HSP70 与 K71A 突变体动力学过程比较相似，而磷酸腺苷对 H227S 突变体与 NR 短肽结合并没有很大的影响。

用 ITC 滴定考察磷酸腺苷如何调节辅助分子伴侣 CHIP 蛋白与 HSP70 的相互作用。发现 ATP 可以直接与 HSP70 相互作用，但 CHIP 蛋白必须在有 ATP 的条件下方可与 HSP70 结合。



我们的实验结果说明 ADP 结合位点突变主要影响 HSP70 帮助变性蛋白的复性功能，不影响变性蛋白降解过程。本研究对于理解细胞蛋白质质量控制系统的调控机制，以及癌症、老年痴呆症的发病机理都有潜在价值。

**关键词：**热休克蛋白 70；助折叠；磷酸腺苷；NR 短肽；CHIP；ITC

## Abstract

Heat shock proteins (HSPs), also named stress proteins, are a highly conserved proteins family in all cells, which are induced by various stresses such as heat, cold and oxygen deprivation. It was found that they also present in cells under normal conditions. The 70kDa heat shock proteins (HSP70s) were the most important member in the heat shock proteins family. They work as molecular chaperones in cells being involved in various cellular functions, such as protein synthesis, folding, translocation, degradation and modulation of protein expression.

As the core of the protein quality control system, HSP70 can identify the denatured protein in both normal and stress conditions. It identifies the exposed hydrophobic surface area of denatured protein or peptide, and then assists them in re-folding, or else, degradation via ubiquitinating mediated proteasome system. HSP70 protein family shares common structure properties: N terminal conserved ATPase domain and the C terminal substrate binding domain. The function of HSP70 is regulated by ATP hydrolysis recycle, the binding and dissociation of ATP or ADP regulates the substrate binding and release.

In the present study, the typical HSP70 substrate, combined with the HSP70 nucleotides binding mutant HSP70K71A, T204A, H227S were used to investigate the mechanism of interaction between HSP70 and substrate.

In refolding experiments, the denatured luciferase was used as a substrate to detect the molecular chaperone function of HSP70. We found HSP70K71A, T204A mutant can not refold the denatured luciferase, in the other hand, H227S mutants could help the refolding of denatured luciferase. ADP inhibited the wild-type HSP70 refolding function significantly, but the second metal binding site mutant H227S does not demonstrate this kind of property. The result further confirmed that the second metal binding sites may be associated with ADP binding.

NR fluorescent labeled peptide was used to investigate dynamic of HSP70 substrate binding. We found that the dynamic process of K71A mutant was similar

with wild-type HSP70, while the nucleotides do not affected the dynamic process of H227S mutant combined with the NR peptide.

ITC titration was used to study how the nucleotides regulate interactions between HSP70 and CHIP protein. We found that ATP play critical role in the interaction of HSP70 and CHIP.

In summarize, our result demonstrates that ATP/ADP play different role in the refolding and degradation of denatured protein.

**Key words:** heat shock protein 70; refolding; nucleotides; NR peptide; CHIP; ITC

## 1 前言

### 1.1 热休克蛋白

1962 年, Ritossa<sup>[1]</sup>在对果蝇的研究中发现25℃ 培养的果蝇幼虫置于30-32℃ 环境30 min 后, 其唾液腺巨大染色体上出现了新的膨突(puff), 显示这一区带转录增强, Ritossa 将这一现象称为“热休克反应”(heat shock respond, HSR)。1974 年, Tissieres 等<sup>[2]</sup>证实高温引起的果蝇染色体蓬松是由于热休克激发染色体基因转录合成特异性的蛋白, 即热应激蛋白(又称热休克蛋白)引起的。由于这类蛋白的合成与HSR 有关, 他们将其称为热休克蛋白(heat shock protein, HSP)。后来总结机体细胞在一些应激原如环境高温、缺氧、重金属中毒、氧化应激、感染、饥饿、创伤、代谢毒物等条件诱导下, 激活HSP 基因, 高效表达的一组进化上高度保守的蛋白质, 对机体免受应激因素的损害具有重要作用。热休克蛋白首先是在应激条件下发现, 后来研究证明其在正常生理条件下亦起重要作用, 并广泛存在于从原核到真核生物的生物界有机体内。对各种热休克蛋白的研究发现, HSPs 是一组在生物进化过程中高度保守的蛋白质分子家族, 如大肠杆菌的热休克蛋白DnaK 与真核生物的热休克蛋白氨基酸序列同源性可以高达50%<sup>[3]</sup>。Morimoto 等<sup>[4]</sup>按照其分子量大小将HSPs 分为4 个家族, 即Hsp90 (83-90kD)家族HSP70 (66-78 kD) 家族、HSP60 家族及小HSP 家族。此外还有分子量为100~110kD 而特性不同于上述家族的大分子HSP。HSPs 所共有的特性为: 1、热应激状态下, 其表达显著增加; 2、在原核细胞与真核细胞中均表达; 3、具有高度保守的氨基酸序列及其编码基因; 4、对细胞具有保护性能, 调控甾类激素及酶系活性, 使细胞对多种有害因素产生抗性; 5、有自身抗原和特异抗原, 能引起抗感染免疫及肿瘤防护, 又能诱导多种自身免疫病。

HSP70 家族(分子量为72 kDa-80 kDa) 成员最多, 共有21 种蛋白质, 是一组在进化上高度保守的应激蛋白。依据划分标准的不同, 对HSP70 家族的分类也不完全相同。大致可分为以下4 种: 第1 种是HSP70, 也称为HSP72, 通常在正常细胞中并不表达或表达量很少。但是在热应激或其它应激原的作用下, 则表达迅速增加, 属于诱导型HSP70; 第2 种为HSC70 (热应激同源蛋白70, heat shock cognate 70), 也称为HSP73, 是哺乳动物细胞内的结构蛋白, 在所有的细胞内均能表达, 并且受热诱导, 属于结构型HSP70; 这两种HSP 具有高度的序列同源性

(95%)和相似的生物化学特性；第3种是GRP78(葡萄糖调节蛋白78 glucose regulated protein 78),这种蛋白存在于内质网腔内；第4种是GRP75,主要位于线粒体内；GRP78和GRP75在应激时稍有表达,它们在细胞内分别以分子伴侣的形式发挥作用<sup>[5]</sup>。

HSP70 家族具有以下生化特点：① 它们的氨基端具有弱的ATPase 活性,与肌肉的肌动蛋白结构很相似；② 当ATPase 被激活时,可与伸展的多肽结合；③ 还可以保护各种酶免受热损伤,使聚合的蛋白质解聚<sup>[6]</sup>。

## 1.2 HSP70 基因与蛋白质结构特点

HSP70 基因没有内含子,转录一旦启动就可产生出成熟的mRNA 来快速表达HSP70,防止应激原对HSP70 mRNA 前体的影响,从而保证了机体对HSP70 的需要。Wistar 大鼠的HSP70 基因和其他HSP70 基因一样,也没有内含子,由2 770 个核苷酸组成,其5' 端非编码区序列长为284 个核苷酸,3' 端非编码区序列长为342 个核苷酸,5' 端上游含“TATA box”(为真核细胞启动子的1 个元件,距转录起始位置30 个核苷酸)和2 个HSE(热应答元件,heat shock element),即HSE I、HSE II,具有增强子(enhancer)的特征。HSP70 基因在进化上具有高度保守性,大鼠HSP70 氨基酸序列与人类HSP70 氨基酸序列的同源性约为95%,与小鼠Hsp70 氨基酸序列的同源性约为98% (Mestril D 等,1994);人HSP70 氨基酸序列与果蝇Hsp70 氨基酸序列的同源性为73%,与大肠杆菌诱导HSP70(即Dnak)氨基酸序列的同源性则为47%(Hunt C 等,1985)。

HSP70 是进化上最保守的蛋白质之一,其结构主要由一个N 端高度保守的44 kDa ATPase 功能域(ATP binding domain) 和一个分子质量为25 kDa 的C 端区域组成。N 端ATPase 功能域的结构类似于凝集素和己糖激酶,如图 1-1 (A): 主要由2 个大的球形亚功能域( globular subdomain) I 和II 组成, 其间被一个深的中央裂缝分开,并通过2 个交叉的 $\alpha$  螺旋相连接,亚功能域和连接的螺旋在裂缝的底部形成一个核苷酸及所需的 $Mg^{2+}$  和 $K^+$  的结合袋,核苷酸通过与两个磷酸结合环和一个疏水腺苷的相互作用而定位在活性部位<sup>[7]</sup>, 并与HSP70 侧链结合的 $Mg^{2+}$  相联系。在多种核苷酸和金属存在下,基于对野生型和突变体HSC70 结构的研究,McKay 等<sup>[8, 9]</sup> 提出了一个ATP 水解机理:即在ATP 与HSP70

结合过程中, 由于HSP70 结构的重排导致ATP 分子中磷酸位置的调整, 从而形成一个和磷氧与 $Mg^{2+}$  的二齿复合物( bidentate complex ), 嵌入的 $H_2O$  ( 或 $OH^-$  ) 对其进行攻击, 致使ATP 水解为ADP。

HSP70 的分子伴侣功能的发挥是底物结合、释放的循环过程, 在此过程中伴随着ATP-ADP 的转换。HSP70 结合ADP 时, 多肽或变性蛋白等底物结合到HSP70 上; 当ADP 变为ATP 时, 底物得以释放<sup>[47, 48, 49]</sup>。一些辅助伴侣如DnaJ、GrpE、HSP40 可以促进ATP-ADP 的转换, 从而提高了HSP70 的伴侣功能<sup>[50, 51]</sup>。1983 年Zylicz 等在研究大肠杆菌中 $\lambda$  噬菌体复制所必需成分DnaK 时发现DnaK 存在微弱的ATPase 活性, 在30 °C 1 mg DnaK 仅可以使15-20 nmol ATP 水解生成ADP 和 $P_i$  ; 同时发现当DnaK 与 $[\gamma-^{32}P]ATP$  温育, DnaK 发生磷酸化反应, 推测是苏氨酸被磷酸化<sup>[52]</sup>。Chappell 等在人、果蝇、酵母等研究中发现HSP70 中都存在ATPase 活性, 其微弱的ATPase 活性可以被特异的底物所激发。后来Chappell 等用糜蛋白酶限制性酶切牛脑HSP70, 获得稳定的44 kDa 片段, 并证实ATP 结合、水解活性中心主要在44 kDa 蛋白片段, 其水解ATP 的速率可达7.2 pmol/min/ $1\mu g$  44 kDa 片段, HSP70 全蛋白的水解速率为4.5 pmol/min/ $1\mu g$  HSP70。又根据HSP70 氨基酸序列设计起始8 个氨基酸合成多肽, 用其做抗原制备抗血清根据抗原-抗体免疫反应确定具有ATPase 活性的44 kDa 蛋白片段位于HSP70 的N 端<sup>[53, 54]</sup>。1998 年Hiromura 等发现HSP70 不仅表现催化ATP 水解活性, 而且表现催化ATP 合成活性。在pH 7.5-8.5 或5 mM ATP 和0.5 mM ADP 的生理浓度下, 二者速率在一相同的范围变化。HSP70 通过催化ATP  $\gamma$ -磷酸基团的转移实现ATP-HSP70 不稳定磷酸化中间体-ADP 的转换。在无ADP 的条件下, HSP70 只表现ATP 水解活性。金属离子如 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 等都可以刺激HSP70 ATP 水解、合成活性<sup>[55]</sup>。但是对HSP70 的ATP-ADP 转换反应的发生部位没有进一步研究。Sriram 等在1.84 Å 分辨率下观察人的HSP70 ATPase 晶体结构分析发现ATPase 功能区域有两个金属结合位点, 一个是位于催化中心的钙离子/镁离子结合位点, 可以与ATP 水解产物ADP  $\beta$ -磷酸基和 $P_i$  键合, 另一个接近第一个结合位点, 与ADP 结合相关, Wu 等通过定点突变技术发现第二个金属结合位点由His-227、Glu-231、Asp-232 形成环状结构, 即His-Leu-Gly-Gly-Glu-Asp, 与第一个结合位点共同参与ATP 水解和合成反应<sup>[56]</sup>。第1 个钙离子结合位点对HSP70 催化ATP 水解及自

身磷酸化非常重要, 71 位赖氨酸和204 位苏氨酸位于ATPase 功能域的催化口袋处, 可以和ADP、磷酸基团形成盐桥连接, 研究发现此两处位点的突变几乎终止了ATPase 活性和ATP 合成活性<sup>[57, 58]</sup>, 通过Lys-71 突变体结构研究推测赖氨酸可能通过稳定亲核基团H<sub>2</sub>O 或OH<sup>-</sup> 攻击  $\gamma$ -磷酸基介导了ATP 的水解<sup>[58]</sup>。第二个钙离子结合位点位于ATP 酶功能区域的表面, 与谷氨酸231, 天冬氨酸232 及组氨酸227 组成1个功能区域, 这个新的金属离子结合中心位于  $\beta$  折叠(190~225 基团)和  $\alpha$  螺旋(230~250 基团)的交叉区域, 可能通过影响第一个Ca<sup>2+</sup> 结合位点与ADP 的结合或者自身与ADP 的结合调节HSP70 的ATP 水解、合成活性。

C 端区域又可以分成一个保守的15 kDa 的多肽结合功能域( polypeptide binding domain) 和一个不保守的靠近C 端的10 kDa 可变区功能域。由于获得C 端多肽结合功能域部分的晶体很困难, 所以其结构于1996 年才弄清楚。Zhu 等<sup>[10]</sup> 研究表明DnaK ( HSP70 同源体)底物结合功能域和部分可变区域的结构主要由两部分组成, 如图 1-1 (B)和图 1-2: 第一部分(N 端)多个  $\beta$  折叠形成成一个紧密的  $\beta$  三明治( $\beta$ -sandwich)结构; 第二部分(C 端)由5 个  $\alpha$  螺旋( $\alpha$ -helices)组成, 形成一个松弛的  $\alpha$  螺旋束结构。N端部分的  $\beta$  三明治结构由底部和上部2 个片层结构组成, 每个片层结构都含有4 条反向平行的  $\beta$  折叠( $\beta$ -sheet)链组成,  $\beta$  3、 $\beta$  6、 $\beta$  7和  $\beta$  8 等4 条链组成三明治结构中相对规则的底部片层,  $\beta$  5、 $\beta$  4、 $\beta$  1和  $\beta$  2 等4 条链组成上部不规则的片层结构,  $\beta$  折叠之间形成一些特殊的环状结构(loop, L)相连, 不规则的上部片层结构与三明治结构伸出的特殊的环联合形成底物结合位点, L1, 2( $\beta$  1和  $\beta$  2 之间形的)L3, 4 ( $\beta$  3和  $\beta$  4)形成一个大小为0.5 nm×0.7 nm 的底物疏水结合通道 (substrate binding channel)。松弛构象的多肽结合在由  $\beta$  三明治结构形成的底物结合通道中, 而  $\alpha$  螺旋部分位于多肽结合单位之上, 象一个盖子覆盖在结合通道上面, 而且不与底物直接接触, 能阻止结合底物的逃逸<sup>[10]</sup>。

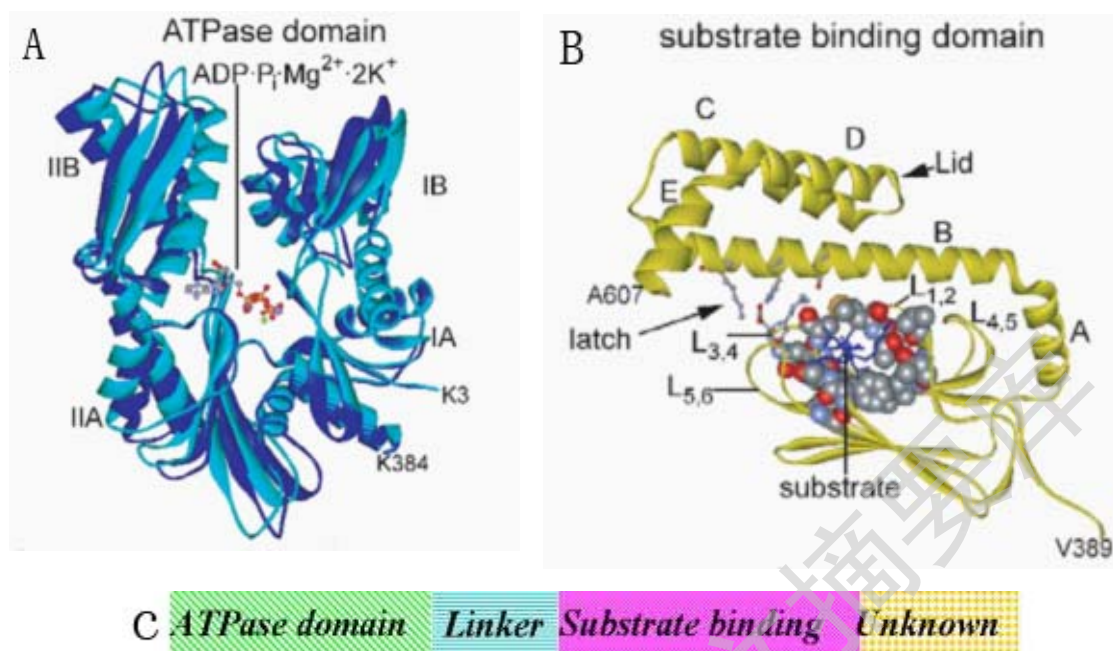


图 1-1 HSP70 ATPase 功能域结构(A)、底物结合功能域结构(B)、以及结构分布示意图(C)

Fig. 1-1 Structures aspects of the ATPase domain and the peptide-binding domain of HSP70 chaperones

(A) ATPase domain of bovine HSC70. Secondary structure representation of the ATPase domain of bovine HSC70 in complex with ADP, inorganic phosphate and two potassium ions. To emphasized the flexibility and shearing motion of the ATPase domain an overlay of the x-ray structure (cyan; PDB entry code 1BUP) and a model derived by NMR using the method of residual dipolar coupling (dark blue) is shown. The two structures were aligned in the program WebLabViewer (Accelrys, San Diego) using tethers in subdomain IA only. (B) Model of the structure of the substrate binding domain. Ribbon representation of the structure of the substrate binding domain of E. coli DnaK (PDB entry code 1DKX) with bound peptide substrate (as stick model). Indicated are residues that contact the substrate in space-filling representation and residues that form the so-called latch of H-bonds and a salt bridge in ball-and-stick representation.

(资料来源: M. P. Mayer et al. Cell. Mol. Life Sci. 62 (2005) 670 - 684)



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库